

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

115126995 CA: 115(13)126995q PATENT

New vitamin B12 derivatives, production thereof, and applications thereof

INVENTOR(AUTHOR): Toraya, Tetsuo; Ishida, Atsuhiko; Uejima, Yasuhide;

Fujii, Katsuhiko

LOCATION: Japan,

ASSIGNEE: Teijin Ltd.

PATENT: PCT International ; WO 9010014 A1 DATE: 900907

APPLICATION: WO 90JP253 (900228) *JP 8945172 (890228)

PAGES: 49 pp. CODEN: PIXXD2 LANGUAGE: Japanese CLASS: C07H-023/00A;

A61K-031/68B; C12N-001/20B; C07F-015/06B DESIGNATED COUNTRIES: US

DESIGNATED REGIONAL: CH; DE; FR; GB; IT

SECTION:

CA201006 Pharmacology

IDENTIFIERS: cyanocobalamin deriv prepn, vitamin B12 deriv neoplasm inhibitor, cell proliferation cyanocobalamin antagonist

DESCRIPTORS:

Animal cell line... Escherichia coli... Lactobacillus leichmannii...

proliferation inhibition of, by vitamin B12 derivs.

Neoplasm inhibitors...

vitamin B12 derivs. as

Microorganism...

vitamin B12-producing, screening of, vitamin B12 derivs. for

CAS REGISTRY NUMBERS:

13870-90-1 activity of, detn. of, in the presence of vitamin B12 antagonist

1128-67-2 as substrate, in cobalamin coenzyme activity inhibition by vitamin B12 antagonists

68-19-9D derivs., as vitamin B12 agonists or antagonists, for cell proliferation inhibition or tumor inhibition

13963-62-7D 27792-36-5D derivs., reaction of, in prepn. of vitamin B12 antagonist or agonist

13963-62-7P 56653-35-1P 134283-17-3P 134283-19-5P 134283-20-8P 134283-21-9P 134283-22-0P 134295-89-9P prepn. and reaction of, for prepg. vitamin B12 antagonist

51390-23-9P 134283-17-3P 134283-18-4P 134283-23-1P prepn. and reaction of, in prepn. of vitamin B12 antagonist

134644-67-0P 134644-68-1P 134644-69-2P 134644-70-5P 134644-71-6P 134691-34-2P 134691-37-5P 134691-39-7P 134714-23-1P 134776-68-4P prepn. of, as vitamin B12 antagonist

68-19-9 reaction of, in prepn. of cyanoaquocobinamide, for prepg. vitamin B12 antagonist

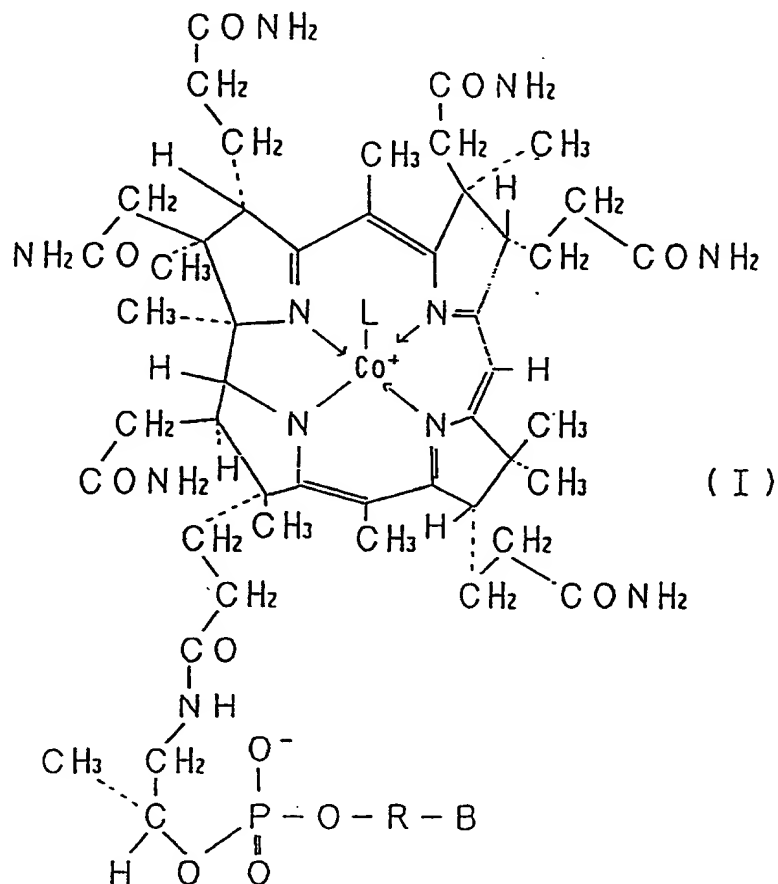
928-51-8 reaction of, in prepn. of hydroxybutyldimethylbenzimidazole, for prepg. vitamin B12 antagonist

582-60-5 reaction of, in prepn. of hydroxyethyldimethylbenzimidazole,



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類⁵ C07H 23/00, A61K 31/68 C12N 1/20, C07F 15/06	A1	(11) 国際公開番号 WO 90/10014 (43) 国際公開日 1990年9月7日 (07. 09. 1990)
(21) 国際出願番号 POT/JP90/00253 (22) 国際出願日 1990年2月28日 (28. 02. 90) (30) 優先権データ 特願平1/45172 1989年2月28日 (28. 02. 89) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 帝人株式会社 (TEIJIN LIMITED) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 虎谷哲夫 (TORAYA, Tetsuo) [JP/JP] 〒700 岡山県岡山市宿本町8番50号 Okayama, (JP) 石田敦彦 (ISHIDA, Atsuhiko) [JP/JP] 〒700 岡山県岡山市大和町1-4-32 シルク21-2035 Okayama, (JP) 上嶋康秀 (UEJIMA, Yasuhide) [JP/JP] 〒191 東京都日野市神明1-6-14 ヘイムSI 210号 Tokyo, (JP) 藤井克彦 (FUJII, Katsuhiko) [JP/JP] 〒191 東京都八王子市台町3-2-18 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 青木 朗, 外 (AOKI, Akira et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 OH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: NEW VITAMIN B₁₂ DERIVATIVE, PRODUCTION THEREOF, AND APPLICATION THEREOF (54) 発明の名称 新規ビタミンB ₁₂ 誘導体、その製造方法及びその用途 <div style="text-align: center;"> <p>(I)</p> </div> (57) Abstract A vitamin B ₁₂ derivative of formula (I) and salts thereof, wherein L represents a ligand bound to the cobalt atom of the corrin ring, B represents a base having a heterocyclic structure, and R represents an (un)substituted hydrocarbon group.		



(式中、Lはコリン環のコバルトへの配位子を示し、Bは複素環式構造を有する塩基を示し、Rは置換または非置換の炭化水素基を示す)

で表されるビタミンB₁₂誘導体及びその塩。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CM カメルーン
DE 西ドイツ
DK デンマーク

ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
HU ハンガリー
IT イタリア
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ

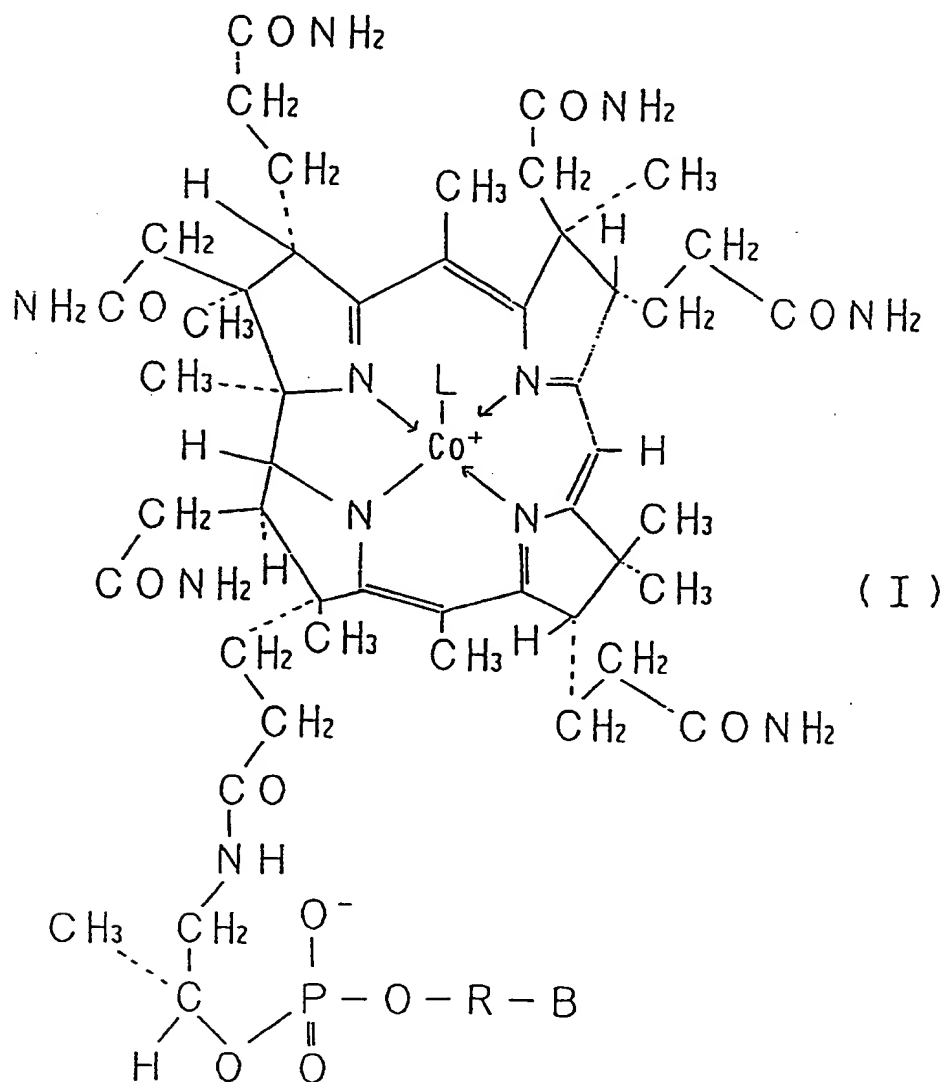
MG マダガスカル
ML マリ
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウェー
RO ルーマニア
SD スーダン
SE スウェーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャード
TG トーゴ
US 米国

明 細 書

新規ビタミンB₁₂誘導体、その製造方法
並びにその用途

技術分野

本発明は、新規なビタミンB₁₂誘導体及びその塩、その製造方法並びにその用途に関する。更に詳しく言えば、一般式
(I)



(式中、Lはコリン環のコバルトへの配位子を示し、Bは複素環式構造を有する塩基を示し、Rは置換または非置換の炭化水素基を示す。)

で表わされるビタミンB₁₂誘導体、その製造方法並びに、それを有効成分として含有するビタミンB₁₂拮抗剤、細胞増殖の抑制または阻害剤等に関する。

背景技術

ビタミンB₁₂は、ヒトなど動物にとって必須の微量栄養因子の一つであり、哺乳動物においては、特に肝臓に多く含まれる。動物、植物とも、この物質を生合成することはできず、微生物のみがこれを産生する。ビタミンB₁₂の欠乏症としては、特に悪性貧血が代表的であり、巨赤芽球性造血、メチルマロン酸尿症、ホモシステイン尿症、神経障害等がみられる。ビタミンB₁₂は、体内に吸収されると、代謝的に活性な型であるビタミンB₁₂補酵素(アデノシルコバラミン)及びメチルコバラミンに変換され、前者は、例えばメチルマロニルCoAムターゼなどの水素の移動を伴う酵素反応に、後者は、例えばメチオニンシンターゼなどのメチル基の移動を伴う酵素反応において、それぞれ補酵素として機能する。特にメチルコバラミンは、葉酸補酵素を介するC₁代謝にかかわることによって、チミジル酸の生合成に間接的に関与し、細胞増殖に重要な役割を果たしている。従って、ビタミンB₁₂群に拮抗作用を示す化合物、すなわちビタミンB₁₂拮抗体は、DNA合成を阻害することによって、細胞の増殖を抑制また

は阻止すると考えられ、腫瘍細胞（ガン細胞）に対して、抗腫瘍剤（抗ガン剤）として有効に作用すると考えられる。また、微生物においても、その増殖にビタミンB₁₂群が重要であり、ビタミンB₁₂拮抗体は、抗菌剤としての作用を有すると考えられる。また、逆に、ビタミンB₁₂拮抗体は、これに対する抵抗性を指標としてビタミンB₁₂高生産性を有する微生物変異株のスクリーニングに役立つと考えられる。

従来、各種ビタミンB₁₂誘導体が合成されており、例えば、コビル酸より、化学的にあるいは微生物を用いて合成された、ビタミンB₁₂群のイソプロパノールアミン部(-NHCH₂CH(CH₃)O-)を、例えば、-NHCH(CH₃)CH₂O-, -NHCH₂CH₂CH₂O-, -NHC(CH₃)₂CH₂O-, -NHCH₂CH(C₆H₅)O-、または-NHCH₂CH(CH₂F)O-等に置換したビタミンB₁₂誘導体が、エシエリヒア・コリ (Escherichia coli) 113-3、ラクトバチルス・ライヒマニ (Lactobacillus leichmannii) に対して拮抗作用を示すことが知られている（フリードリッヒ、Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoide (Georg Thieme Verlag, Stuttgart), 289-308頁、1975年）。また、微生物から単離されたコバルト欠如コリノイド、またはコバルト欠如コリノイドに、例えばロジウム、銅、亜鉛を導入した異種金属コリノイドも、前記の菌に対して同様に拮抗作用を示すことが知られている。（フリードリッヒ、Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoide (Georg Thieme Verlag, Stuttgart), 289-308頁、1975年、及びコペンハーゲン、B₁₂ (John Wiley & Sons, New York)、Ⅱ巻、105-149頁、1982年）。

しかしながら、コビル酸を用いる場合には、その調製が複雑で大量供給が困難であり、微生物を用いる場合には、その単離の点で実用性に問題がある。

また、コリン環のC-10位に臭素、もしくはニトロ基を導入したビタミンB₁₂誘導体、また、コリン環周辺側鎖を、例えばカルボキシル基、エチルアミド、アニリド、ヒドラジドに置換したビタミンB₁₂誘導体も化学的に合成されている

(フリードリッヒ、Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoide (Georg Thieme Verlag, Stuttgart), 289-308頁、1975年)が、これらの誘導体は拮抗作用の点で未だ不十分である。

従って、ビタミンB₁₂拮抗作用に優れ、かつ大量供給可能なビタミンB₁₂拮抗体が望まれていた。

発明の開示

従って、本発明は、ビタミンB₁₂拮抗作用に優れ、かつ大量供給可能な新規なビタミンB₁₂拮抗体を提供することを目的とする。

本発明はまたビタミンB₁₂拮抗作用に優れかつ大量供給可能なビタミンB₁₂誘導体の製造方法を提供することを目的とする。

本発明は更に新規なビタミンB₁₂拮抗剤を提供することを目的とする。

本発明は更にまた新規な細胞増殖抑制又は阻害剤を提供することを目的とする。

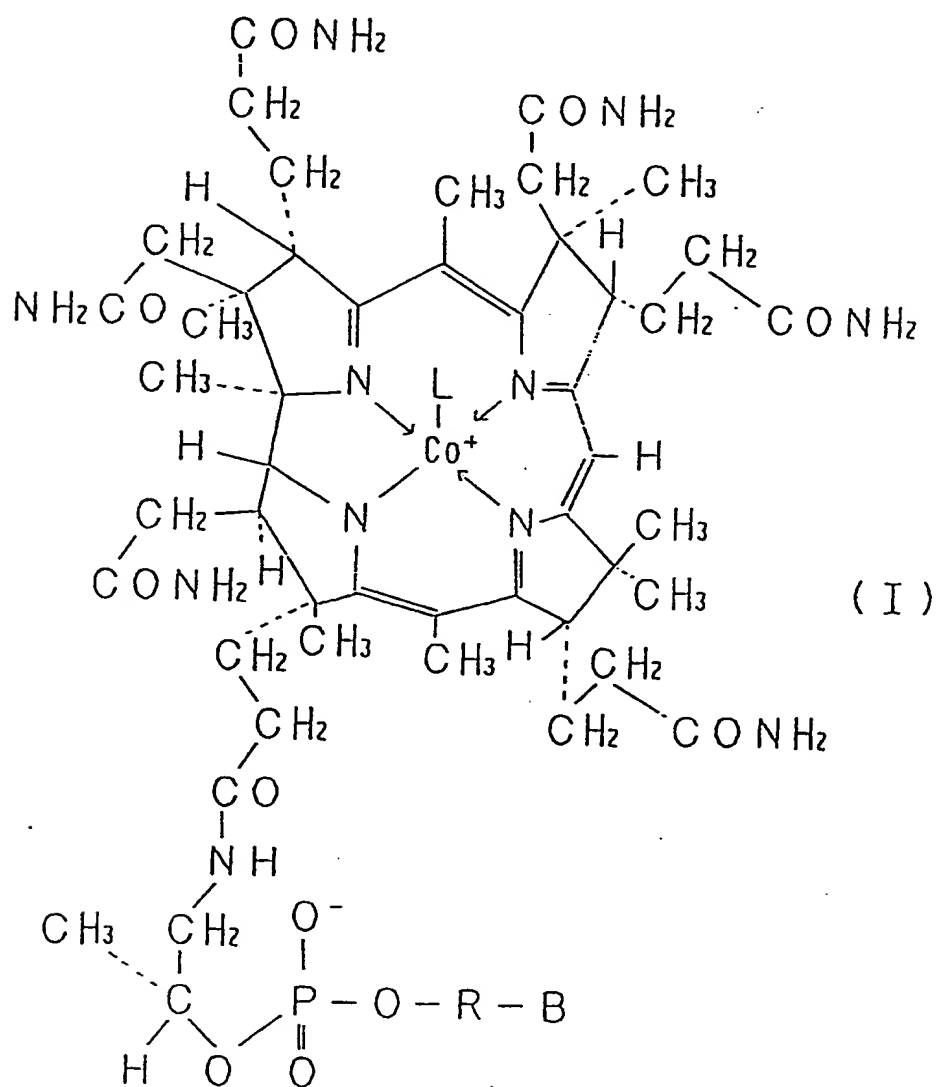
本発明は更にまた新規な抗腫瘍剤を提供することを目的と

する。

本発明は更にまたビタミンB₁₂高生産性微生物変異株をスクリーニングする方法を提供することを目的とする。

本発明のその他の目的及び利点は以下の説明から明らかである。

本発明に従えば、一般式 (I)



(式中、Lはコリン環のコバルトへの配位子を示し、Bは複素環式構造を有する塩基を示し、Rは置換または非置換の炭化水素基を示す。)

で表わされるビタミンB₁₂誘導体及びその塩並びにそれを有効成分として含むビタミンB₁₂拮抗剤並びに細胞増殖抑制又は阻害剤、抗腫瘍剤が提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明のビタミンB₁₂誘導体の、マウス白血病L₁₂₁₀細胞に対するin vitro増殖阻害活性を示す。

図中、Aはコントロールを示し、またBはメソトレキセート(MTX) (200nM)、CはMTX (200nM) と実施例2で得られたビタミンB₁₂誘導体(50nM)、D及びEは、MTX (200nM) と実施例5で得られたビタミンB₁₂誘導体を各々50nM及び5000nMを添加した結果である。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、前記した従来技術の問題点を解決すべく、鋭意研究を進めた結果、ビタミンB₁₂群のヌクレオチド部分のリボース部を修飾することによって得られる一般式(I)のビタミンB₁₂誘導体は、大量供給可能であり、かつビタミンB₁₂拮抗剤として、優れた作用を有することを見出した。

一般式(I)で表わされるビタミンB₁₂誘導体において、Lはコリン環のコバルトへの配位子を示す。Lによって示される配位子の例としては、シアノ基、置換もしくは非置換の

アデノシル基もしくはアデニニルアルキル基（アルキル基は、炭素数 1～8 の直鎖、または分枝鎖のアルキル基）、ヒドロキシル基、水分子、又は炭素数 1～8 の直鎖もしくは分枝鎖のアルキル基等が挙げられ、更に、L がこれらの基の同一若しくは異なる 2 個で表わされることもある。かかる炭素数 1～8 のアルキル基としては、好ましくはメチル基、エチル基、プロピル基が挙げられる。配位子 L は、一般にはコリン環の上方に配位するが、コリン環のいずれか片側にあってもよいし、またその両側に存在してもかまわない。

一般式 (I) において、R は置換または非置換の炭化水素基であって、例えば、芳香族基もしくはハロゲン原子で置換された、または非置換の炭素数 1～8 の直鎖もしくは分枝鎖のアルキレン基、または環状の炭化水素基が挙げられる。なかでも、炭素数 1～8 のアルキレン基が好ましい。

一般式 (I) において、B は、複素環式構造を有する塩基を示し、例えば、置換もしくは非置換のイミダゾール基、ピリジン基、またはそれらの誘導体等が挙げられる。かかる誘導体としては、イミダゾール基にベンゼン環が縮合したベンズイミダゾール基、またはその誘導体である 5, 6 - ジメチルベンズイミダゾール基等が挙げられる。かかる塩基 B は、通常コリン環のコバルトの下方に配位しているが、本発明においては、配位していない場合も含まれる。

また、本発明は、一般式 (I) で表わされるビタミン B₁₂ 誘導体の製造方法である。

すなわち、①シアノアクアコビンアミドもしくはジシアノ

コビンアミドを、次式 (II)



(式中、B及びRは前記式(I)の定義に同じ。)で表わされるリン酸エステル誘導体又はその塩と反応させ、Lがシアノ基である対応する一般式(I)で表わされる化合物を製造する。

一般式(II)で表わされる化合物と、シアノアクアコビンアミドもしくはジシアノコビンアミドとの反応は、例えば縮合剤、好ましくはジシクロヘキシルカルボジイミドを用いて、有機溶媒中、好ましくはピリジン及びN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液で行なうことができる。反応温度は、用いた溶媒の沸点以下で、例えば室温付近が好ましい。シアノアクアコビンアミドは、ビタミンB₁₂(シアノコバラミン)、もしくはジシアノコビンアミドより容易に調製される。反応の結果得られた、Lがシアノ基である一般式(I)で表わされる化合物は、例えば抽出、カラムクロマトグラフィー、及び(または)高速液体クロマトグラフィーにより精製できる。

あるいは②Lがシアノ基である一般式(I)で表わされる化合物を、還元し、次いでa)再酸化することにより、あるいはb)アルキル化、次いで光分解することにより、Lがヒドロキシル基、または水分子である一般式(I)で表わされる化合物にするか、あるいは③Lがシアノ基、ヒドロキシル基、または水分子である一般式(I)で示される化合物を、例えば水素化ホウ素ナトリウム、亜鉛と塩化アンモニウム、亜鉛と酢酸、または2価のクロムで還元し、次いで、例えば

ハロゲン化アルカン（アルキル基は、炭素数 1～8 の直鎖、または分枝鎖のアルキル基、好ましくは、メチル基、エチル基、プロピル基）、またはハロゲン化もしくはトシル化された置換もしくは非置換のアデノシンもしくはアデニニルアルカン（アルキル基は、炭素数 1～8 の直鎖、または分枝鎖のアルキル基）例えば好ましくは 5' - ハロ - 5' - デオキシアデノシンと反応させ、対応する一般式（I）で表わされる化合物を製造することができる。これらの化合物は、例えば抽出、カラムクロマトグラフィーにより、精製物として得ることができる。得られた一般式（I）で表わされる化合物を、例えば硫酸等と塩を形成せしめることもできる。

さらにまた、本発明は、一般式（II）で表わされるリン酸エステル誘導体及びその塩、並びにその製造方法に関する。これらのリン酸エステル誘導体及びその塩は、一般式（I）で表わされる本発明のビタミン B₁₂ 誘導体製造に用いられる有用な中間体であり、以下の方法によって得ることができる。

すなわち、一般式（II）で表わされるリン酸エステル誘導体及びその塩は、複素環式構造を有する遊離の塩基 B' と次式（III）



（式中、X は脱離基を示し、R は前記式（I）の定義に同じ。）で表わされる化合物とを反応させ、次式（IV）



（式中、B 及び R は前記式（I）の定義に同じ。）で表わされる化合物を得、次いで、これをリン酸化、好ましくは 2 -

シアノエチルリン酸ピリジン塩を用いてリン酸化することにより製造される。

複素環式構造を有する遊離の塩基 B' は、例えば置換もしくは非置換の、イミダゾール、ピリジン、またはそれらの誘導体であって、イミダゾール誘導体としては、例えば、ベンズイミダゾール、または 5, 6-ジメチルベンズイミダゾール等が挙げられる。これらの化合物 B' は、市販品として得ることができ、または公知の方法によって製造することができる。

一般式 (Ⅲ) で表わされる化合物において、 X は、例えばハロゲン原子、好ましくは塩素からなる脱離基を示す。一般式 (Ⅲ) で表わされる化合物は、市販品として、または公知の方法により得ることができる。

複素環式構造を有する遊離の塩基 B' と、一般式 (Ⅲ) で表わされる化合物の反応は、塩基、好ましくは水素化ナトリウム、又は炭酸カリウムの存在下で、反応温度は、好ましくは室温付近で行われ、また還流加熱下で行なってもかまわない。この反応は、有機溶媒中、好ましくは N, N -ジメチルホルムアミド、またはジオキサン中で行われる。反応生成物である一般式 (Ⅳ) で示される化合物は、粗製物として以下の反応に用いることができるが、好ましくは公知の方法、例えば洗浄、抽出、またはカラムクロマトグラフィーにより、反応混合物から分離精製して用いられる。

一般式 (Ⅳ) で表わされる化合物のリン酸化は、例えば縮合剤の存在下で、好ましくは 2-シアノエチルリン酸ピリジ

ン塩を用い、次いで水酸化リチウムと反応させることにより行なわれる。縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミドが好ましく、反応は、有機溶媒中、好ましくはピリジン中に行なわれ、反応温度は、用いた溶媒の沸点以下で、好ましくは室温付近で行なわれる。2-シアノエチルリン酸ピリジン塩は、テナーの方法 (J. Am. Chem. Soc., 83巻、159-168頁、1961年) に従い、2-シアノエチルリン酸バリウム塩から容易に調製することができる。反応生成物である一般式 (II) で表わされる化合物は、粗製物として、一般式 (I) で表わされるビタミンB₁₂誘導体製造の中間体に用いることができ、所望により、公知の方法、例えば濾過、抽出、またはカラムクロマトグラフィーにより、反応混合物から分離精製することができる、あるいは、所望により、公知の方法により、例えばリチウム、ナトリウム、カリウム、バリウムまたはピリジン等との塩の形で得ることができる。

一般式 (I) で表わされるビタミンB₁₂誘導体は、非常に有益な薬理学的性質を備えている。これらの化合物は、ビタミンB₁₂拮抗体としての作用を有し、ビタミンB₁₂拮抗剤として使用することができる、既知のビタミンB₁₂拮抗体と比べても、優れた拮抗作用を示す。さらに、一般式 (I) で表わされるビタミンB₁₂誘導体は、前記製造方法により、原料としてシアノアクアコビンアミドもしくはジシアノコビンアミドを用いるため、既知のビタミンB₁₂拮抗体に比べても、簡便、かつ大量に供給することができる。また、本発明の一般式 (I) で表わされるビタミンB₁₂誘導体は、その少なくと

も1種を有効成分として含有する細胞増殖抑制または阻害剤、例えば、細胞が微生物の場合は、抗菌剤として、又は細胞が動物細胞、特に腫瘍細胞（ガン細胞）の場合は、抗腫瘍剤（抗ガン剤）として用いることができる。かかる細胞増殖抑制または阻害剤として用いる場合には、一般式（I）で表わされるビタミンB₁₂誘導体の少なくとも1種の有効成分と医薬的に許容される担体及び（または）必要な添加物とからなる医薬的調製物とすることができる。

本発明の一般式（I）で表わされるビタミンB₁₂誘導体は、ビタミンB₁₂群に対して拮抗的に作用するため、例えば、ビタミンB₁₂を高生産する微生物に対しては、一般式（I）で表わされるビタミンB₁₂誘導体の増殖阻害作用は弱くなるか、またはその阻害作用を示さなくなる。従って、本発明は、ビタミンB₁₂高生産性微生物変異株のスクリーニングの目的で、本発明のビタミンB₁₂誘導体を使用することも対象としている。

以上述べた様に、本発明のビタミンB₁₂誘導体は、ビタミンB₁₂拮抗剤としての作用を有し、酵素反応におけるビタミンB₁₂群の、例えば補酵素機能の研究において、非常に有用である。さらに、本発明のビタミンB₁₂誘導体は優れた拮抗作用を示し、かかるビタミンB₁₂誘導体を有効成分として含有する細胞増殖抑制または阻害剤は、例えば抗菌剤、または抗腫瘍剤（抗ガン剤）として有用である。また、本発明のビタミンB₁₂誘導体は、ビタミンB₁₂高生産性微生物変異株のスクリーニングに使用することができる。さらに、本発明の

ビタミンB₁₂誘導体は、原料としてシアノアコビンアミドもしくはジシアノコビンアミドを用いるため、簡便かつ大量に供給可能である。

本発明の前記一般式（I）のビタミンB₁₂誘導体及びその医薬的に許容される塩はそれ自体単独で投与してもよいが、必要又は所望により他の通常の医薬的に許容される汎用の担体、賦形剤、溶剤、希釈剤等と混合して所望の剤型として経口的又は非経口的に投与することができる。経口投与剤は、錠剤、丸剤、顆粒剤、散剤、液剤、懸濁剤、カプセル剤等のいずれであってもよい。非経口的投与剤は、皮下、および皮膚用軟膏、クリーム、ゲル等のいずれの形状のものであってもよい。経気道的投与剤は、エアロゾルまたはその他の適当な噴霧手段を用いて経気道的に投与される。

本発明の前記一般式（I）のビタミンB₁₂誘導体又はその医薬的に許容される塩を有効成分として含む組成物の錠剤は、例えば乳糖、デンプン、結晶セルロース等の賦形剤と、必要に応じ、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤；および／又はアルギン酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム等の崩壊剤等を有効成分に混合し、この混合物を通常の方法により成形することにより製造される。液剤、又は懸濁剤を製造するには、例えばトリカプリリン、トリアセチンなどのグリセリンエステル類、エタノール等のアルコール類などを有効成分に混合し、この混合物に通常の方法を適用すればよい。カプセル剤を製造するには、顆粒剤、散剤あるいは液剤などを有効成分とともにゼ

ラチン等のカプセル形成材料に混合し、これにカプセル成形法を適用すればよい。

注射剤は、水性あるいは非水性溶液剤などの形態に応じ、有効成分を、例えば生理食塩水、エタノール、プロピレングリコールなどの溶媒に溶解し、必要に応じて防腐剤、安定剤などを添加して製造される。

座剤としては、有効成分を含むゼラチンソフトカプセル等の通常の剤形のものが用いられる。

軟膏、クリーム等は、有効成分と、所要の担体とから、通常の方法によって形成される。

エアロゾル投与剤としては、炭素数6～22の脂肪酸、脂肪酸多価アルコールまたはその環状無水物等から作られた、医薬的に許容される界面活性剤と、炭素数5以下のアルカンあるいはフッ素化アルカン等の噴射剤と、有効成分とを用いて製造することができる。

かかる医薬製剤中の一般式(I)のビタミンB₁₂誘導体及びその医薬的に許容される塩の濃度には特に限定はないが、一般には製剤中に0.001～50重量%程度、好ましくは0.01～10重量%程度が適当である。又、その用量にも特に限定はないが0.01～500mg/日/人、好ましくは0.1～100mg/日/人が適当であり、投与回数は通常1日当り1～4回である。

実施例

次に実施例を示して、本発明を具体的に説明するが、本発明は、実施例により限定されるものではない。

〔実施例 1〕 2 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル)
エチルシアノコピンアミドリン酸の合成

実施例 1 において以下の操作を行なった。

1) 1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 , 6 - ジメチルベン
ズイミダゾールの合成

1.46 g の 5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾールを、50 ml の乾燥 N , N - ジメチルホルムアミドに溶解し、0.96 g の NaH を加え、氷水浴中で 30 分間攪拌した。これに、エチレンクロルヒドリン 5 ml を滴下し、15 時間室温で攪拌後、さらに 0.78 g の NaH を適宜添加しながら、24 時間反応を行った。反応の停止は、50 ml の水を加えることにより行ない、得られた反応液は、n - ヘキサンで洗浄後、水を加え、HCl で pH を 2.5 に調整してから、イオン交換カラム (ダウエックス 50 (水素イオン型)) にかけた。溶出は、水、30% エタノール、アンモニア性 30% エタノールで順次行い、アンモニア性 30% エタノールで溶出される画分を減圧下で濃縮乾固することにより、粗製 1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾールを得た。この化合物への、5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾールからの変換率は、薄層クロマトグラフィーによる検定で、75% であった。

さらに、得られた粗製 1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾールを、50% メタノールに溶解し、不溶物を除去後、逆相の高速液体クロマトグラフィーにより精製を行ない、減圧下で濃縮乾固して、精製 1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾール

を得た。

^{13}C -NMR(CDC ℓ_3 , δ ppm)

20.13, 20.51, 48.11, 60.43, 109.54, 119.59, 130.82,
131.83.

2) 2-シアノエチルリン酸ピリジン塩の調製

テナーの方法(J. Am. Chem. Soc., 83巻、159-168頁、1961年)に従って、2-シアノエチルリン酸ピリジン塩の調製を行なった。すなわち、2-シアノエチルリン酸バリウム塩 1.61 g とイオン交換樹脂(ダウエックス50(水素イオン型))10 g を水中に懸濁し、室温で30分間攪拌した後、その上清及び水による洗浄液にピリジン 2 ml を加えて、減圧下で濃縮乾固し、これにピリジンを加え、1 mmol/ml の2-シアノエチルリン酸ピリジン塩溶液を得た。

3) 2-(5, 6-ジメチルベンズイミダゾリル)エチルリン酸の合成

0.19 g の粗製 1-(2-ヒドロキシエチル)-5, 6-ジメチルベンズイミダゾールと 2 ml の2-シアノエチルリン酸ピリジン塩溶液(1 mmol/ml)を乾燥ピリジン 20 ml に溶解し、減圧下で濃縮乾固した。この操作をさらに2回繰り返し、さらに真空ポンプにて十分に乾燥させた後、これを乾燥ピリジン 20 ml に溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド 1.67 g を添加して、室温で2日間攪拌した。これに水を加えてから、減圧下で濃縮乾固を行ない、次いでLiOH水溶液(0.5 N) 40 ml を加えて、45分間 100℃で反応させた。反応液を濾過して濾液を得、これに水を加え、HCl でpHを2.5~3に調整して

から、イオン交換カラム（ダウエックス50（水素イオン型））にかけた。溶出は、水、2 Nピリジンで順次行ない、後者で溶出される画分を、減圧下で濃縮乾固することによって、粗製2-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）エチルリン酸0.27 gを得た。

4）シアノアクアコビンアミドの調製

1 gのシアノコバラミン（ビタミンB₁₂）を144 mlの水に溶解し、これに、0.33 MのCe(NO₃)₃水溶液を76.8 ml及び1 NのNaOH溶液を51.2 ml添加した。次いで、この混合物に、1.77 gのKCNを加え、90～100℃で1時間攪拌した後、室温まで冷却し、pHを8.5に調整してから、4℃で一晩放置した。これを濾過して、その濾液を、フェノール抽出による脱塩を行なってから、イオン交換カラム（ジエチルアミノエチルセルロース（アセテート型））にかけた。水で溶出される画分に少量の酢酸を加え、減圧下で濃縮乾固することにより、粗製のシアノアクアコビンアミドを得た。これを、さらに、ホスホセルロースカラム（pH 7）にかけ、50%エタノール、50 mMのNaCl溶液で順次溶出し、後者で溶出される画分を、フェノール抽出により脱塩して、精製シアノアクアコビンアミドを800 mg得た。

5）2-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）エチルシアノコビンアミドリノ酸の合成

0.27 gの粗製2-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）エチルリン酸、及び0.2 gの精製シアノアクアコビンアミドをピリジン5 mlに溶解し、減圧下で濃縮乾固した。この操作

をさらに2回繰り返し、さらに真空ポンプにて充分乾燥させた後、これに、乾燥N,N-ジメチルホルムアミド15ml、乾燥ピリジン10ml、及びジシクロヘキシルカルボジイミド1.5gを加え、室温で12日間攪拌し、水及びKCNの添加により反応を停止させた。反応混合物は、フェノール抽出により脱塩を行なった後、ホルホセルロースカラム(pH3)にかけ、次いで、その素通り画分を、イオン交換カラム(ジエチルアミノエチルセルロース(アセテート型))にかけた。さらに、その素通り画分を、逆相の高速液体クロマトグラフィーで精製し、濃縮乾固品として、50mgの精製2-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)エチルシアノコピンアミドリン酸を得た。得られた2-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)エチルシアノコピンアミドリン酸は、逆相の高速液体クロマトグラフィー、及び薄層クロマトグラフィーにて、単一であることが確認された。さらに、得られた2-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)エチルシアノコピンアミドリン酸をセリウム加水分解することにより、1-(2-ヒドロキシエチル)-5,6-ジメチルベンズイミダゾールが、定性的及び定量的に得られることを、薄層クロマトグラフィー及び逆相の高速液体クロマトグラフィーで確認した。

〔実施例2〕 3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)
プロピルシアノコピンアミドリン酸の合成
実施例2において以下の操作を行なった。

1) 1-(3-ヒドロキシプロピル)-5,6-ジメチルベンズイミダゾールの合成

1.46 g の 5,6-ジメチルベンズイミダゾールを、50 ml の乾燥 N,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、0.76 g の NaH を加え、室温で30分間攪拌した。これに、3-クロロ-1-プロパノール 5 ml を滴下し、2日間室温で攪拌して反応させた後、水を加えて反応を停止させた。以下、実施例 1 と同様の操作により、粗製 1-(3-ヒドロキシプロピル)-5,6-ジメチルベンズイミダゾールを得た。この化合物への、5,6-ジメチルベンズイミダゾールからの変換率は、90% であった。

さらに、粗製 1-(3-ヒドロキシプロピル)-5,6-ジメチルベンズイミダゾールを、50%メタノールに溶解し、逆相の高速液体クロマトグラフィーで精製し、減圧下で濃縮乾固し、精製 1-(3-ヒドロキシプロピル)-5,6-ジメチルベンズイミダゾールを得た。

^{13}C -NMR (CDC ℓ_3 , δ ppm)

20.04, 20.40, 31.71, 41.16, 58.47, 109.97, 120.38, 131.21, 132.28.

^1H -NMR (CDC ℓ_3 , δ ppm)

2.0~2.2 (2H, m), 2.35 (3H, s), 2.37 (3H, s),
3.58 (2H, t, J=6.0Hz), 4.30 (2H, t, J=7.0Hz),
7.18 (1H, s), 7.54 (1H, s), 7.78 (1H, s).

2) 3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)プロピルリン酸の合成

出発物質として、粗製 1-(3-ヒドロキシプロピル)-5,6-ジメチルベンズイミダゾールを 0.2 g、及び 2-シアノエチルリン酸ピリジン塩溶液 (1 mmol/ml) を 2 ml 用い、以下、実施例 1 と同様の操作により、粗製 3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)プロピルリン酸 0.3 g を得た。

3) 3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)プロピルシアノコビンアミドリン酸の合成

出発物質として、粗製 3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)プロピルリン酸を 0.3 g、及び精製シアノアコビンアミドを 0.2 g 用い、以下、実施例 1 と同様の操作により、33mg の精製 3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)プロピルシアノコビンアミドリン酸を得た。ただし、反応時間は 3.5 日とした。また、この化合物が単一であることの確認も、実施例 1 と同様に行なった。さらに、得られた 3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)プロピルシアノコビンアミドリン酸をセリウム加水分解することにより、1-(3-ヒドロキシプロピル)-5,6-ジメチルベンズイミダゾールが、定性的及び定量的に得られることを、薄層クロマトグラフィー及び逆相の高速液体クロマトグラフィーで確認し、また、その ^{13}C -NMR 及び ^1H -NMR も、実施例 2 の 1) で得られた 1-(3-ヒドロキシプロピル)-5,6-ジメチルベンズイミダゾールのそれに一致した。

〔実施例 3〕 4 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル)
ブチルシアノコビンアミドリン酸の合成

実施例 3 において以下の操作を行なった。

1) 1 - (4 - ヒドロキシブチル) - 5 , 6 - ジメチルベン
ズイミダゾールの合成

1.46 g の 5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾールを、50 ml の乾燥 N , N - ジメチルホルムアミドに溶解し、0.9 g の NaH を加え、室温で 30 分間攪拌した。これに、4 - クロロ - 1 - ブタノール 8 ml を滴下して、室温で 1 日攪拌した後、さらに 0.65 g の NaH、及び 2 ml の 4 - クロロ - 1 - ブタノールを適宜添加して、8 日間反応を行なった。以下、実施例 1 と同様の操作により、粗製 1 - (4 - ヒドロキシブチル) - 5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾールを得た。この化合物への、5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾールからの変換率は、50%であった。

2) 4 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル) ブチルリ
ン酸の合成

出発物質として、粗製 1 - (4 - ヒドロキシブチル) - 5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾールを 0.2 g、及び 2 - シアノエチルリン酸ピリジン塩溶液 (1 mmol / ml) を 2 ml 用い、以下、実施例 1 と同様の操作により、粗製 4 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル) ブチルリン酸 0.3 g を得た。

3) 4 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル) ブチルシ
アノコビンアミドリン酸の合成

出発物質として、粗製 4 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミ

ダゾリル) ブチルリン酸を 0.3 g、及び精製シアノアコ
ビンアミドを 0.2 g 用い、以下、実施例 1 と同様の操作によ
り、15mg の精製 4-(5, 6-ジメチルベンズイミダゾリル)
ブチルシアノコビンアミドリン酸を得た。ただし、反応時間
は 6 日とした。また、この化合物の確認は、薄層クロマトグ
ラフィーを用いて、実施例 1 と同様の操作により行なった。

〔実施例 4〕 6-(5, 6-ジメチルベンズイミダゾリル)
ヘキシルシアノコビンアミドリン酸の合成

実施例 4 において以下の操作を行なった。

1) 1-(6-ヒドロキシヘキシル)-5, 6-ジメチルベ
ンズイミダゾールの合成

1.46 g の 5, 6-ジメチルベンズイミダゾールを、50 ml の
乾燥 N, N-ジメチルホルムアミドに溶解し、0.84 g の NaH
を加え、さらに 8.2 ml の 6-クロロ-1-ヘキサノールを添
加して、1 日間室温で攪拌して反応させた後、水を加えて反
応を停止させた。以下、実施例 1 と同様の操作により、粗製
1-(6-ヒドロキシヘキシル)-5, 6-ジメチルベンズ
イミダゾールを得た。この化合物への、5, 6-ジメチルベ
ンズイミダゾールからの変換率は、95% 以上であった。

2) 6-(5, 6-ジメチルベンズイミダゾリル) ヘキシル
リン酸の合成

出発物質として、粗製 1-(6-ヒドロキシヘキシル)-
5, 6-ジメチルベンズイミダゾールを 0.2 g、及び 2-シ
アノエチルリン酸ピリジン塩溶液 (1 mmol/ml) を 2 ml 用い、

以下、実施例 1 と同様の操作により、粗製 6 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル) ヘキシルリン酸 0.35 g を得た。

3) 6 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル) ヘキシルシアノコビンアミドリン酸の合成

出発物質として、粗製 6 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル) ヘキシルリン酸を 0.35 g、及び精製シアノアコビンアミドを 0.2 g 用い、以下、実施例 1 と同様の操作により、20mg の精製 6 - (5 , 6 - ジメチルベンズイミダゾリル) ヘキシルシアノコビンアミドリン酸を得た。ただし、反応時間は 5 日とした。この化合物の確認は、薄層クロマトグラフィーを用いて、実施例 1 と同様の操作により行なった。

〔実施例 5〕 3 - イミダゾリルプロピルシアノコビンアミドリン酸の合成

実施例 5 において以下の操作を行なった。

1) 1 - (3 - ヒドロキシプロピル) イミダゾールの合成

1.7 g のイミダゾールを、125 ml のジオキサンに溶解し、これに炭酸カリウム 17.25 g を加え、さらに 13.8 ml の 3 - クロロ - 1 - プロパノールを滴下して、7.5 時間還流加熱した。得られた反応混合物は、濾過により炭酸カリウムを除いた後、水を加えて反応を停止させ、pH を 2.5 に調整してから、イオン交換カラム (ダウエックス 50 (水素イオン型)) にかけた。溶出は、水、30% エタノール、アンモニア性 30% エタノールで順次行ない、アンモニア性 30% エタノールで溶出される画分を濃縮し、これを、ホスホセルロースカラム (pH 8) にか

け、素通り画分を、減圧下で濃縮乾固することにより、2.5 g の精製 1 - (3 - ヒドロキシプロピル) イミダゾールを得た。

^{13}C -NMR (D_2O , δ ppm)

34.86, 45.75, 60.51, 122.54, 130.05, 140.26.

2) 3 - イミダゾリルプロピルリン酸の合成

出発物質として、精製 1 - (3 - ヒドロキシプロピル) イミダゾールを 0.13 g、及び 2 - シアノエチルリン酸ピリジン塩溶液 (1 mmol/ml) を 2 ml 用い、以下、実施例 1 と同様の操作により、粗製 3 - イミダゾリルプロピルリン酸 0.2 g を得た。

3) 3 - イミダゾリルプロピルシアノコビンアミドリン酸の合成

出発物質として、粗製 3 - イミダゾリルプロピルリン酸を 0.2 g、及び精製シアノアクアコビンアミドを 0.2 g 用い、以下、実施例 1 と同様の操作により、20 mg の精製 3 - イミダゾリルプロピルシアノコビンアミドリン酸を得た。ただし、反応時間は 3 週間とした。また、この化合物の確認は、逆相の高速液体クロマトグラフィー、 ^{13}C -NMR、及び ^1H -NMR で、実施例 2 と同様の操作により行なった。

〔実施例 6〕 2 - (5, 6 - ジメチルベンズイミダゾリル)

エチルアデノシルコビンアミドリン酸の調製

10 mg の 2 - (5, 6 - ジメチルベンズイミダゾリル) エチルシアノコビンアミドリン酸を 3 ml の水に溶解し、これに、

100mgのNaBH₄を添加し、密封した。これを15分間放置して還元した後、暗所で、25mgの5'-ヨード-5'-デオキシアデノシンを3mlのN,N-ジメチルホルムアミドと共に、この密封容器中に注入し、水冷しながら、さらに30分間放置した。以下の操作は暗所で行なった。得られた反応液に、水及び1Mリン酸カリウム緩衝液(pH5.0)を加え、次いで、これを吸着カラム(アンバーライトXAD-2)にかけ、水、80%エタノールで順次溶出した。後方で溶出される画分を、減圧下で濃縮乾固した後、少量の水に溶かし、これをイオン交換カラム(カルボキシメチルセルロース(水素イオン型))にかけ、水、50mMのNaCl溶液で順次溶出した。後方で溶出される画分を、吸着カラム(アンバーライトXAD-2)によって脱塩後、さらに、イオン交換カラム(ホスホセルロースカラム(pH6))により精製を行ない、減圧下で濃縮乾固して、精製2-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)エチルアデノシルコビンアミドリン酸を得た。

〔実施例7〕 3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)

プロピルアデノシルコビンアミドリン酸の調製

実施例7において、実施例6の2-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)エチルシアノコビンアミドリン酸の代わりに、3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)プロピルシアノコビンアミドリン酸を用いて、実施例6と同様の操作により、3-(5,6-ジメチルベンズイミダゾリル)プロピルアデノシルコビンアミドリン酸を得た。

〔実施例 8〕 4-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）

ブチルアデノシルコピンアミドリン酸の調製

実施例 8 において、実施例 6 の 2-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）エチルシアノコピンアミドリン酸の代わりに、4-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）ブチルシアノコピンアミドリン酸を用いて、実施例 6 と同様の操作により、4-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）ブチルアデノシルコピンアミドリン酸を得た。

〔実施例 9〕 6-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）

ヘキシルアデノシルコピンアミドリン酸の調製

実施例 9 において、実施例 6 の 2-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）エチルシアノコピンアミドリン酸の代わりに、6-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）ヘキシルシアノコピンアミドリン酸を用いて、実施例 6 と同様の操作により、6-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）ヘキシルアデノシルコピンアミドリン酸を得た。

〔実施例 10〕 3-イミダゾリルプロピルアデノシルコピンア

ミドリン酸の調製

実施例 10 において、実施例 6 の 2-（5，6-ジメチルベンズイミダゾリル）エチルシアノコピンアミドリン酸の代わりに、3-イミダゾリルプロピルシアノコピンアミドリン酸を用いて、実施例 6 と同様の操作により、3-イミダゾリルプロピルアデノシルコピンアミドリン酸を得た。

〔実施例11〕 ビタミンB₁₂誘導体の補酵素活性の測定

実施例1～10において調製されたビタミンB₁₂誘導体の補酵素活性を、以下に示した2つの方法により測定した。

1) 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンを用いた補酵素活性の測定

虎谷らの方法(J. Biol. Chem., 252巻、963-970頁、1977年)に従って行なった。

酵素として、ジオールデヒドラーゼを用いた。本酵素は、アデノシルコバラミン、すなわちビタミンB₁₂補酵素を補酵素とする酵素であり、ビタミンB₁₂補酵素(アデノシルコバラミン)非存在下では作用を示さない。ジオールデヒドラーゼは、ボズナンスカヤらの方法(Arch. Biochem. Biophys., 194巻、379-386頁、1979年)に従い、クレブシエラ・ニウモニア(*Klebsiella pneumoniae* ATCC 8724)より高度に精製し、0.05Mリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)で、0.3 Unit/mlの溶液にした。本酵素の基質としては、1Mの1,2-プロパンジオール水溶液を用いた。

氷浴中で、0.1 mlの基質溶液、0.1 mlの0.5 M塩化カリウム水溶液、0.1 mlのジオールデヒドラーゼ溶液、及び0.6 mlの0.05Mリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)を混合し、これに、暗所で、0.2 mMのビタミンB₁₂補酵素(アデノシルコバラミン)、ビタミンB₁₂(シアノコバラミン)、または実施例1～10において調製された各ビタミンB₁₂誘導体0.1 mlを添加した。これを、暗所で10分間37℃に保温後、1 mlの0.1 Mクエン酸カリウム緩衝液(pH3.6)を加えて、酵素反応を停止

させ、0.1%の3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン水溶液0.5 mlを添加し、さらに15分間37℃で保温を続けた。これに、水1 mlを加え、島津ダブルビーム分光光度計UV-140-02型にて、305nmの吸光度を測定することにより、補酵素活性 (k_{cat}) を算出した。

2) アルコールデヒドロゲナーゼ及び還元型ニコチンアミド
アデニンジヌクレオチドを用いた補酵素活性の測定

虎谷らの方法 (Biochemistry, 18巻、417-426頁、1979年) に従って行なった。

ジオールデヒドラーゼは、0.05Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) で0.15Unit/mlにしたものを用い、その基質としては、1Mの1,2-プロパンジオール水溶液を用いた。また、0.05Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) により、0.5 mg/mlのアルコールデヒドロゲナーゼ、及び2 mMの還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを調製した。0.1 mlの基質溶液、0.1 mlのアルコールデヒドロゲナーゼ溶液、0.1 mlの還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド溶液、及び0.5 mlの0.05Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) を混合し、これに、0.1 mlのジオールデヒドラーゼ溶液を添加した。これを、5分間37℃で保温した後、暗所で、0.2 mMのビタミンB₁₂補酵素 (アデノシルコバラミン)、ビタミンB₁₂ (シアノコバラミン)、または実施例1~10において調製された各ビタミンB₁₂誘導体0.1 mlを添加し、ユニオン分光光度計SM-401にて、340nmの吸光度の減少を経時的に追跡することにより、補酵素活性 (k_{cat}) を算出した。

上記の 1) または 2) の方法で算出された補酵素活性 (k_{cat}) を表 1 に示した。 k_{cat} が大きいほど補酵素活性が強いことを示す。ビタミン B_{12} 補酵素 (アデノシルコバラミン) の補酵素活性に対する相対活性 (%) も表 1 に示した。実施例 6 及び実施例 9 において調製されたビタミン B_{12} 誘導体は、補酵素活性を示さなかった。

〔実施例 12〕 ビタミン B_{12} 誘導体のミハエリス定数及び (または) 阻害定数の測定

実施例 11 において、補酵素活性を示したビタミン B_{12} 誘導体については、ミハエリス定数 (K_m) を求めた。すなわち、実施例 11 の方法 1) において、ビタミン B_{12} 誘導体の濃度を適宜変えることによって、それぞれの酵素活性を測定し、ライソウェーバー・パーク・プロットによりミハエリス定数 (K_m) を求めた。結果は表 1 に示した。 K_m が小さいほど酵素との親和性 (結合性) が強いことを示す。

また、実施例 11 において、補酵素活性を示さなかったビタミン B_{12} 誘導体については、阻害定数 (K_i) を求めた。すなわち、実施例 11 の方法 1) において、一定量の各ビタミン B_{12} 誘導体の濃度に対して、ビタミン B_{12} 補酵素 (アデノシルコバラミン) の濃度を適宜変えて添加することによって、このときの酵素活性をそれぞれ測定し、ライソウェーバー・パーク・プロットにより阻害定数 (K_i) を求めた。結果は表 1 に示した。 K_i が小さいほど阻害活性が強いことを示す。

表 1

化 合 物	k _{cat}		K _m	K _i
	(S ⁻¹)	(%)	(μM)	(μM)
対 照 例 (ビタミンB ₁₂ 補酵素)	337	100	0.80	-
実施例 6	-	-	-	52
" 7	199	59	0.82	-
" 8	167	50	11.2	-
" 9	-	-	-	38
" 10	3	0.9	1.1	1.0
ビタミンB ₁₂	-	-	-	1.9
実施例 1	-	-	-	24
" 2	-	-	-	0.9
" 3	-	-	-	3.0
" 4	-	-	-	43
" 5	-	-	-	3.7

〔実施例13〕 ビタミンB₁₂誘導体のエシエリヒア・コリ
(*Escherichia coli*)215に対する増殖促進活性
及び増殖阻害活性

エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*)215はビタミン
B₁₂要求性の変異株であり、池田らによって見出され、ビタ
ミンB₁₂のバイオアッセイに用いられている(ビタミン、10
巻、268-279頁、1956年)。すなわち、この菌は、ビタミン
B₁₂の非存在下では増殖できず、ビタミンB₁₂依存的に増殖

を示す。

本実験に用いた、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 215 の培地組成を表 2 に示した。

表 2

KH_2PO_4	0.6 g
K_2HPO_4	1.4 g
クエン酸ナトリウム	0.1 g
MgSO_4	0.01 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2 g
NaCl	0.1 g
D-グルコース	2.0 g
水	200 ml

表 2 に示した培地に、ビタミン B_{12} (シアノコバラミン)、または実施例 1 ~ 5 において合成された各ビタミン B_{12} 誘導体を、それぞれ 0.1 ~ 100 ng/ml の濃度範囲で濃度を変えて分注し、これを 5 分間 120℃ で蒸圧滅菌した。これらの培地に、予め、L-メチオニン 1.5 mg/ml を含む表 2 に示した培地と同じ組成の前培養培地で培養しておいたエシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 215 菌体を集菌後、生理食塩水で充分洗浄してから接種し、37℃ で一晚静置培養した。これらの培養液の濁度を島津ダブルビーム分光光度計 UV-140-02 型を用いて、660nm で測定することにより、菌体の増殖度とした。最大増殖の 2 分の 1 を与えるビタミン B_{12} (シアノコバ

ラミン)、または各ビタミンB₁₂誘導体のモル濃度を増殖促進活性($K_{1/2(g)}$)と定義し、結果を表3に示した。 $K_{1/2(g)}$ が小さいほど増殖促進活性が強いことを示す。実施例1～5において合成されたビタミンB₁₂誘導体は、増殖促進活性を示さなかった。

また、表2に示した培地に、ビタミンB₁₂(シアノコバラミン)を0.1 ng/mlの濃度となるように添加し、さらに、実施例1～5において合成されたビタミンB₁₂誘導体を、それぞれ1～80 ng/mlの濃度範囲で濃度を変えて分注し、これを5分間120℃で蒸圧滅菌した。これらの培地に、前記と同様の方法で前培養して、集菌、洗浄した菌体を接種し、37℃で一晩静置培養した後、菌体の増殖度を培養液の濁度(660nm)で求めた。また、ビタミンB₁₂誘導体を添加しないで同様の実験を行ない、このときの増殖度の2分の1を与える、各ビタミンB₁₂誘導体添加モル濃度を増殖阻害活性($K_{1/2(i)}$)と定義した。さらに、次式(V)

$$ID_{50} = K_{1/2(i)} / C \quad (V)$$

(式中Cは、用いたビタミンB₁₂(シアノコバラミン)のモル濃度を示す。)

により、ビタミンB₁₂誘導体の拮抗阻害活性の指標として、ID₅₀を算出した。結果は表3に示した。 $K_{1/2(i)}$ が小さいほど増殖阻害活性が、ID₅₀が小さいほど拮抗阻害活性が強いことを示す。

表 3

化合物	$K_{1/2(g)}$ (nM)	$K_{1/2(i)}$ (nM)	ID ₅₀
ビタミンB ₁₂	0.18	-	-
実施例 1	-	58.0	785
" 2	-	4.6	62
" 3	-	7.2	98
" 4	-	8.0	108
" 5	-	35.2	477

〔実施例14〕 ビタミンB₁₂誘導体のラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830 に対する増殖促進活性及び増殖阻害活性

ラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) は、スケッグスらにより、ビタミンB₁₂要求性であることが見出され(J.Biol.Chem., 184巻、211-221頁、1950年)、*Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830を用いたビタミンB₁₂定量用のキットは市販品として容易に入手できる。すなわち、日水製薬のライヒマニ用ビタミンB₁₂定量用基礎培地「ニッスイ」を、ラクトバチルス・ライヒマニ (*Lactobacillus leichmannii*) ATCC 7830の培地として用い、説明書に記載の方法に従って、培地を調製し、これに、ビタミンB₁₂ (シアノコバラミン)、または実施例1～5において合成されたビタミンB₁₂誘導体を、それぞれ0.1～100ng/mlの濃度範囲で濃度を変えて分注し、5分間120℃で蒸圧滅菌した。これ

らの培地に、所定の方法に従って、菌体を接種し、37℃で一晩静置培養した。菌体の増殖度は、実施例13に記載した方法と同様にして測定し、増殖促進活性 ($K_{1/2(g)}$) を求めた。結果は表4に示した。本菌に対して、実施例2～4において合成されたビタミンB₁₂誘導体は増殖促進活性を示したが、非常に弱いものであった。また、実施例1及び実施例5において合成されたビタミンB₁₂誘導体は、増殖促進活性を示さなかった。

また、上記の基礎培地に、ビタミンB₁₂ (シアノコバラミン) を0.05ng/mlの濃度となるように添加し、さらに、実施例1～5において合成されたビタミンB₁₂誘導体を、それぞれ適宜濃度を変えて添加し、これを5分間120℃で蒸圧滅菌した。これらの培地に、所定の方法に従って、菌体を接種し、37℃で一晩静置培養し、菌体の増殖度を実施例13に記載した方法と同様にして測定した。また、ビタミンB₁₂誘導体を添加せずに同様の実験を行ない、実施例13に記載された方法に従って、増殖阻害活性 ($K_{1/2(i)}$)、及び拮抗阻害活性 (ID₅₀) を求めた。その結果を表4に示した。

表 4

化合物	$K_{1/2(g)}$ (nM)	$K_{1/2(i)}$ (nM)	ID ₅₀
ビタミン B ₁₂	0.047	-	-
実施例 1	-	86	2330
" 2	1.5	-	-
" 3	0.5	-	-
" 4	10	-	-
" 5	-	213	5772

〔実施例15〕 ビタミン B₁₂誘導体の、マウス白血病 L₁₂₁₀細胞に対する *in vitro* 増殖阻害活性

本実験に用いたマウス白血病 L₁₂₁₀細胞は、DBAマウスの腹腔内で増殖・維持したものを腹水と共に無菌的に取り出し、ウシ胎仔血清（5 v/v%）及びエタノールアミン（1.2 mg/ℓ）を含む動物細胞培養用の RPMI-1640培地からビタミン B₁₂（シアノコバラミン）を除去した培地に適応させて培養した。また本培地 1 ℓにつき抗菌剤としてペニシリンを10万単位、ストレプトマイシンを 100mg 添加した。*in vitro*で増殖適応させた L₁₂₁₀細胞はさらに藤井らの方法（J. Biol. Chem., 256巻、10329-10334頁、1981年）に従い、ウシ胎仔血清の代りにウシ血清アルブミンを 7.0 g/ℓ 濃度で含有する上記培地に適応させた後実験に供した。

実施例 2 及び 5 において合成されたビタミン B₁₂誘導体の

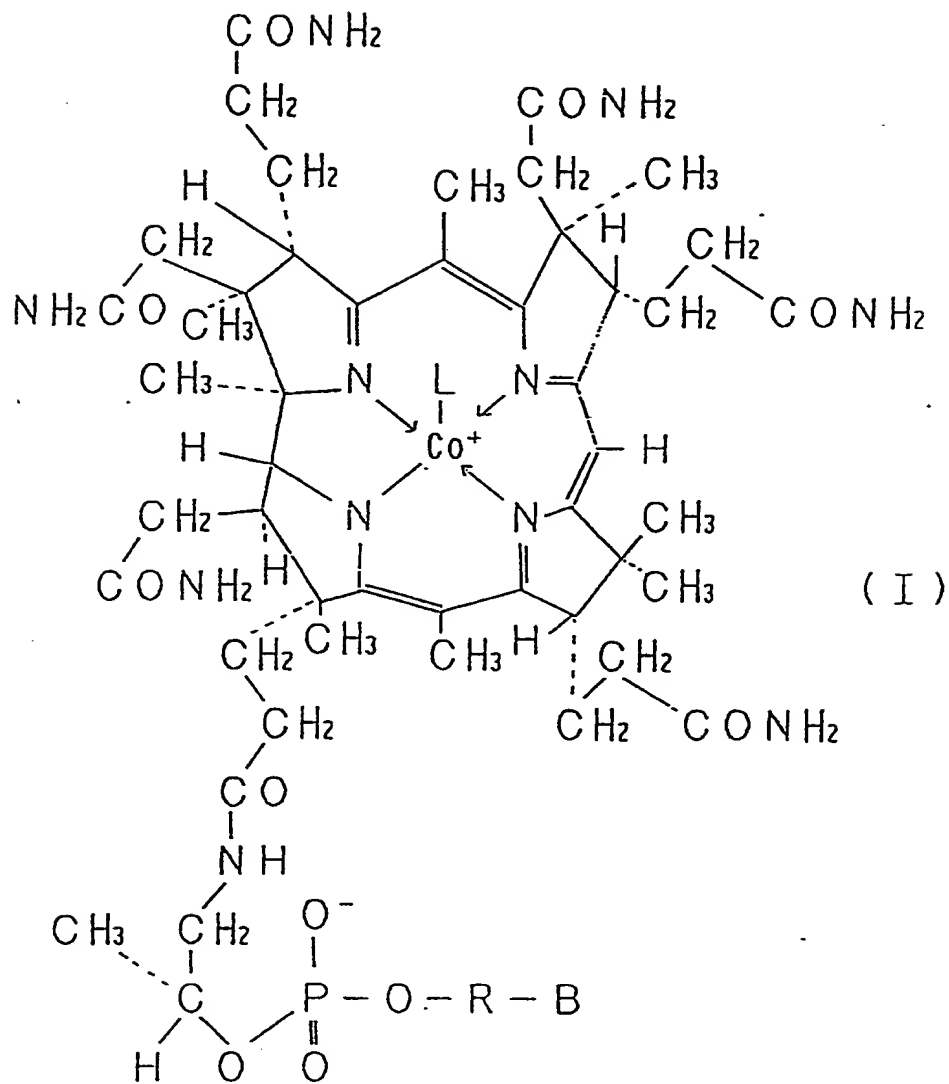
L₁₂₁₀増殖阻害活性を調べる目的には、まずアルブミンに適応させたL₁₂₁₀細胞を10 μ M濃度の葉酸を含む同培地に5 \times 10⁴ cells/mlの密度で接種し、湿気を含むCO₂/air(5%/95%)気下、3日間37℃で前培養を行なった。増殖した細胞を遠心分離した後、葉酸を含まない同培地で2回洗浄し、約5 \times 10⁴ cells/mlの接種細胞懸濁液を調製した。本培養はアルブミンを含む上記基本培地に葉酸の代りに5-メチルテトラヒドロ葉酸を10 μ M、ビタミンB₁₂(シアノコバラミン)を0.5 nMになるように添加し、これに洗浄した細胞を5 \times 10⁴ cells/ml密度で接種し、上記条件下で9日間迄培養を続けた。実施例2及び5において合成されたビタミンB₁₂誘導体のL₁₂₁₀細胞増殖阻害活性は本培養の際に、ビタミンB₁₂要求性を増幅させる目的で添加したメソトレキセート(MTX)200 nMと実施例2のビタミンB₁₂誘導体(50 nM)、実施例5のビタミンB₁₂誘導体(50 nM, 5000 nM)を各々共存させることにより調べた。MTX、及びMTXと本発明のビタミンB₁₂誘導体共存下の場合のマウス白血病L₁₂₁₀に対する増殖阻害性を、Coulter計測器による3, 5, 7及び9日目の細胞密度の測定で明らかにした結果を第1図に示す。なお、対照例(コントロール)としてMTX及び本発明のビタミンB₁₂誘導体の両者無添加の場合の増殖測定結果も同時に第1図に示す。第1図から、本発明の化合物はL₁₂₁₀に対して増殖抑制作用を示し、抗腫瘍作用があることが明らかである。

第1図に示した9日目の培養細胞(図中、曲線Eで示される実施例5で得られた本発明のビタミンB₁₂誘導体(5000 nM)

を添加して培養したもの) をトリパン・ブルーで染色することにより生死判定を行なった所、MTX 単独添加の場合には20%の細胞が死滅しているにすぎないのに対し、MTX と実施例5のビタミンB₁₂誘導体を共存させた場合には90%の細胞が死滅していた。

請求の範囲

1. 一般式 (I) :



(式中、Lはコリン環のコバルトへの配位子を示し、Bは複素環式構造を有する塩基を示し、Rは置換または非置換の炭

化水素基を示す)

で表わされるビタミンB₁₂誘導体及びその塩。

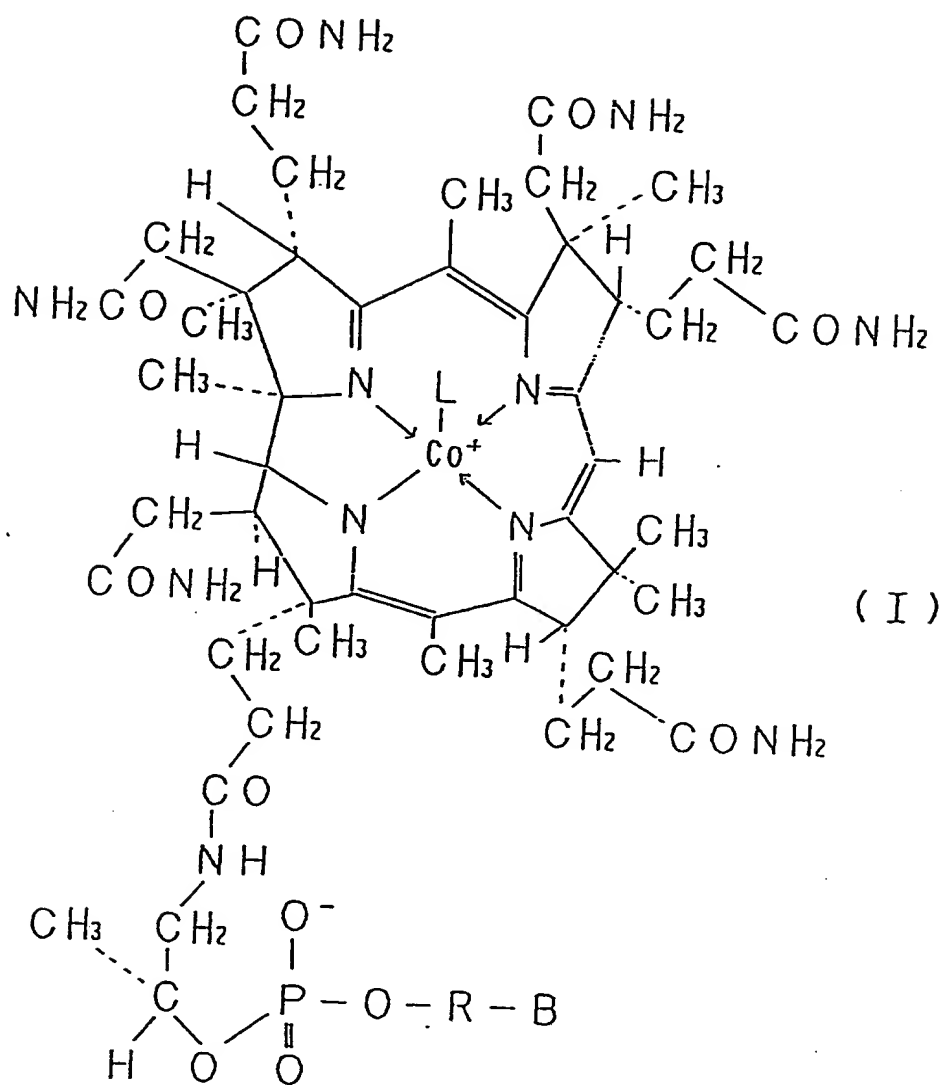
2. Lが、シアノ基、置換もしくは非置換のアデノシル基もしくはアデニルアルキル基、ヒドロキシル基、水分子、及び炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖のアルキル基から選ばれる1個又は同一もしくは異なる2個の配位子である請求の範囲1記載のビタミンB₁₂誘導体及びその塩。

3. Rが、芳香族基もしくはハロゲン原子で置換されたまたは非置換の、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖のアルキレン基または環状の炭化水素基である請求の範囲1記載のビタミンB₁₂誘導体及びその塩。

4. Rが、炭素数1～8の直鎖のアルキレン基である請求の範囲1記載のビタミンB₁₂誘導体及びその塩。

5. Bが、置換または非置換の、イミダゾール基、ピリジン基、またはそれらの誘導体である請求の範囲1記載のビタミンB₁₂誘導体及びその塩。

6. シアノアクアコビンアミドもしくはジシアノコビンアミドを出発物質として一般式(I)



(式中、Lはコリン環のコバルトへの配位子を示し、Bは複素環式構造を有する塩基を示し、Rは置換または非置換の炭化水素基を示す。)

で表わされるビタミンB₁₂誘導体及びその塩の製造方法において、

- ① シアノアクアコビンアミドもしくはジシアノコビンアミドと下記式 (II)



(式中、B 及び R は前記式 (I) の定義に同じ。)

で表わされるリン酸エステル誘導体又はその塩とを縮合反応に付して、前記式 (I) において L がシアノ基であるビタミン B₁₂ 誘導体を製造すること、

② 前記①で得られた、前記式 (I) において L がシアノ基であるビタミン B₁₂ 誘導体を還元反応に付し、次いで a) 酸化反応に付すか、b) アルキル化した後光分解することにより、前記式 (I) において L がヒドロキシル基、又は水分子であるビタミン B₁₂ 誘導体を製造すること、あるいは

③ 前記①または②で得られた、前記式 (I) において L がシアノ基、ヒドロキシル基、または水分子であるビタミン B₁₂ 誘導体を還元反応に付し、次いでハロゲン化された炭素数 1～8 の直鎖もしくは分枝鎖のアルカン、またはハロゲン化もしくはトシル化された置換もしくは非置換のアデノシンもしくはアデニルアルカンと反応させることにより、前記式 (I) において L が炭素数 1～8 の直鎖もしくは分枝鎖のアルキル基、置換もしくは非置換のアデノシル基もしくはアデニルアルキル基であるビタミン B₁₂ 誘導体を製造すること

を特徴とするビタミン B₁₂ 誘導体及びその塩の製造方法。

7. B が、置換または非置換の、イミダゾール基、ピリジン基、またはそれらの誘導体である請求の範囲 6 記載のビタ

ミン B₁₂誘導体及びその塩の製造方法。

8. Rが、芳香族基もしくはハロゲン原子で置換されたまたは非置換の、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖のアルキレン基または環状の炭化水素基である請求の範囲6記載のビタミン B₁₂誘導体及びその塩の製造方法。

9. 次式(Ⅱ)



(式中、Bは複素環式構造を有する塩基を示し、Rは置換または非置換の炭化水素基を示す。)

で表わされるリン酸エステル誘導体及びその塩。

10. Bが、置換または非置換の、イミダゾール基、ピリジン基、またはそれらの誘導体である請求の範囲9記載のリン酸エステル誘導体及びその塩。

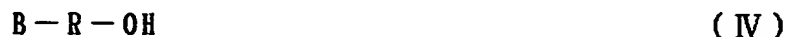
11. Rが、芳香族基もしくはハロゲン原子で置換されたまたは非置換の、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖のアルキレン基または環状の炭化水素基である請求の範囲9記載のリン酸エステル誘導体及びその塩。

12. 複素環式構造を有する遊離の塩基 B' を、一般式(Ⅲ)



(式中、Xは脱離基を示し、Rは置換または非置換の炭化水素基を示す。)

で表わされる化合物と反応させ、一般式(Ⅳ)



(式中、Bは複素環式構造を有する塩基を示し、Rは前記式(Ⅲ)の定義に同じ。)

で表わされる化合物を得、次いでリン酸化反応に付すことを特徴とする請求の範囲9記載の一般式(Ⅱ)で表わされるリン酸エステル誘導体及びその塩の製造方法。

13. 複素環式構造を有する遊離の塩基B'が、置換または非置換の、イミダゾール、ピリジン、またはそれらの誘導体である請求の範囲12記載のリン酸エステル誘導体及びその塩の製造方法。

14. Rが、芳香族基もしくはハロゲン原子で置換されたまたは非置換の、炭素数1～8の直鎖もしくは分枝鎖のアルキレン基または環状の炭化水素基である請求の範囲12記載のリン酸エステル誘導体及びその塩の製造方法。

15. リン酸化反応を、2-シアノエチルリン酸ピリジン塩を用いて行なうことを特徴とする請求の範囲12記載のリン酸エステル誘導体及びその塩の製造方法。

16. 請求の範囲1記載の一般式(Ⅰ)で表わされるビタミンB₁₂誘導体又はその医薬的に許容される塩を有効成分として含有するビタミンB₁₂拮抗剤。

17. 請求の範囲1記載の一般式(Ⅰ)で表わされるビタミンB₁₂誘導体又はその医薬的に許容される塩を有効成分として含有する細胞増殖抑制または阻害剤。

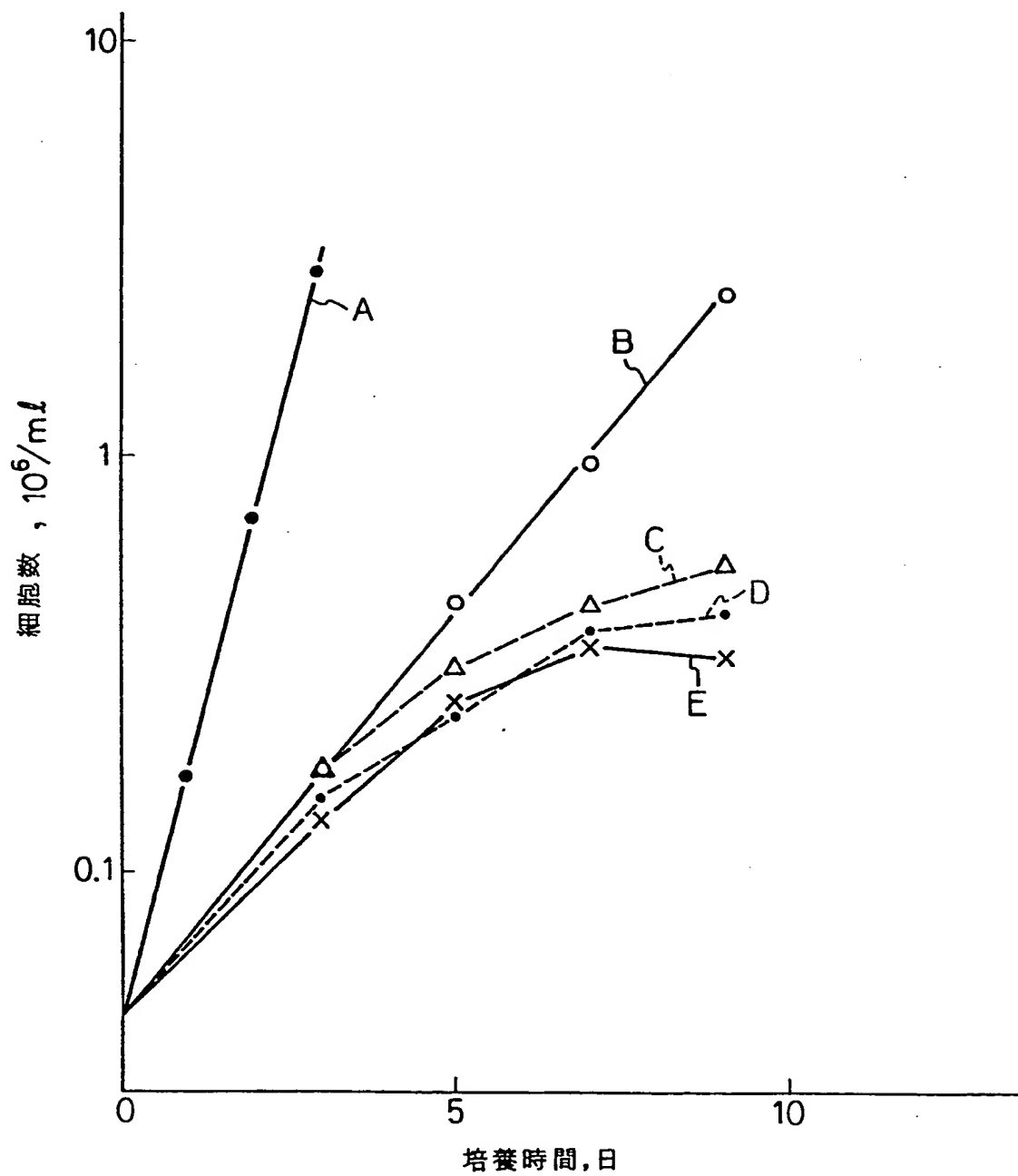
18. 請求の範囲1記載の一般式(Ⅰ)で表わされるビタミンB₁₂誘導体又はその医薬的に許容される塩を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

19. 請求の範囲1記載の一般式(Ⅰ)で表わされるビタミンB₁₂誘導体又はその塩を用いて、ビタミンB₁₂高生産性微

生物変異株のスクリーニングをする方法。

1/1

Fig.1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/JP90/00253**

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; padding: 10px;"> Int. Cl⁵ C07H23/00, A61K31/68, C12N1/20, C07F15/06 </div>											
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; padding: 5px;"> Minimum Documentation Searched ⁷ </div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC</td> <td style="padding: 10px;">C07H23/00, A61K31/68 - 71, C07F15/06, C12N1/20</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; padding: 5px;"> Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸ </div>			Classification System	Classification Symbols	IPC	C07H23/00, A61K31/68 - 71, C07F15/06, C12N1/20					
Classification System	Classification Symbols										
IPC	C07H23/00, A61K31/68 - 71, C07F15/06, C12N1/20										
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">A</td> <td style="padding: 10px;">EP, A, 69450 (TECNICON INSTRUMENT Inc.), 12 January 1983 (12. 01. 83) & JP, A, 58-997 & US, A, 4465775</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1 - 19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">A</td> <td style="padding: 10px;">DE, A, 2752756 (ROUSSEL UCLAF), 1 June 1978 (01. 06. 78) & JP, A, 53-65990 & GB, A, 1549930</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1 - 19</td> </tr> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	A	EP, A, 69450 (TECNICON INSTRUMENT Inc.), 12 January 1983 (12. 01. 83) & JP, A, 58-997 & US, A, 4465775	1 - 19	A	DE, A, 2752756 (ROUSSEL UCLAF), 1 June 1978 (01. 06. 78) & JP, A, 53-65990 & GB, A, 1549930	1 - 19
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³									
A	EP, A, 69450 (TECNICON INSTRUMENT Inc.), 12 January 1983 (12. 01. 83) & JP, A, 58-997 & US, A, 4465775	1 - 19									
A	DE, A, 2752756 (ROUSSEL UCLAF), 1 June 1978 (01. 06. 78) & JP, A, 53-65990 & GB, A, 1549930	1 - 19									
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> ¹⁰ Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			¹⁰ Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family							
¹⁰ Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family										
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; padding: 10px;">May 11, 1990 (11. 05. 90)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; padding: 10px;">May 28, 1990 (28. 05. 90)</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority <div style="text-align: center; padding: 10px;">Japanese Patent Office</div> </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; padding: 10px;">May 11, 1990 (11. 05. 90)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; padding: 10px;">May 28, 1990 (28. 05. 90)</div>	International Searching Authority <div style="text-align: center; padding: 10px;">Japanese Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer					
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; padding: 10px;">May 11, 1990 (11. 05. 90)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; padding: 10px;">May 28, 1990 (28. 05. 90)</div>										
International Searching Authority <div style="text-align: center; padding: 10px;">Japanese Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer										

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. G07H23/00, A61K31/68, G12N1/20, G07F15/06		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	G07H23/00, A61K31/68-71, G07F15/06 G12N1/20	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	EP, A, 69450 (TECONICON INSTRUMENT Inc.), 12. 1月. 1983 (12. 01. 83) & JP, A, 58-997 & US, A, 4465775	1-19
A	DE, A, 2752756 (ROUSSEL UOLAF), 1. 6月. 1978 (01. 06. 78) & JP, A, 53-65990 & GB, A, 1549930	1-19
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 11. 05. 90	国際調査報告の発送日 28.05.90	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 横 尾 俊 一	407822